MANUEL TECHNIQUE

Kit Maxwell® CSC DNA FFPE

Mode d'emploi du produit

AS1350

Ce produit est destiné à être vendu uniquement aux États-Unis et au Canada.

Attention: manier les cartouches avec précaution – les bords de la bande adhésive peuvent être tranchants.



Révisé 1/15
TM395



Kit Maxwell® CSC DNA FFPE

Toute la documentation technique est disponible à l'adresse : www.promega.com/protocols/
Veuillez consulter ce site Internet pour vérifier que vous utilisez la version la plus à jour de ce manuel technique.
Si vous avez des questions sur l'utilisation de ce système, veuillez contacter le service technique de Promega à l'adresse techserv@promega.com.

1. Description

Le Kit Maxwell® CSC DNA FFPE[a] est utilisé en conjonction avec l'appareil Maxwell® pour permettre la purification automatisée, efficace et aisée, d'ADN génomique (ADNg) à partir d'échantillons de tissus mammaires, pulmonaires ou colorectaux humains fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE). L'appareil Maxwell® CSC est fourni avec des méthodes préprogrammées de purification et est conçu pour être utilisé avec des cartouches de réactifs pré-dispensés et des réactifs supplémentaires fournis dans le kit, pour une simplicité et une facilité d'emploi maximales. Cet appareil peut traiter jusqu'à 16 échantillons en moins de 60 minutes. L'ADN purifié peut être utilisé directement dans les essais d'amplification ultérieurs tels que la PCR.

Le Kit Maxwell® CSC DNA FFPE purifie les acides nucléiques à l'aide de particules paramagnétiques, offrant une phase solide mobile permettant d'optimiser la capture des échantillons, le lavage et la purification de l'ADNg. Le Maxwell® CSC est un appareil de manipulation des particules magnétiques. Ce système permet à l'ADNg de se lier efficacement aux particules paramagnétiques dans le premier puits d'une cartouche préremplie et fait progresser l'échantillon d'un puits à l'autre de la cartouche en le mélangeant au cours du traitement. Cette approche de capture magnétique évite certains problèmes courants propres à d'autres systèmes automatisés fréquemment utilisés, tels que l'obstruction des cônes de pipettes ou le transfert incomplet des réactifs, qui peuvent entraîner une purification suboptimale.



2. Composants du produit et conditions de stockage

PRODUIT	CONDITIONNEMENT	RÉF.
Kit Maxwell® CSC DNA FFPE	**48 préparations**	**AS1350**

Pour le diagnostic in vitro. Destiné à un usage professionnel uniquement. Contient assez de réactifs pour 48 purifications automatisées à partir d'échantillons de tissus fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE). Les cartouches Maxwell® FFPE sont à usage unique. Comprend :

- 25 ml Huile minérale
- 20 ml Tampon de lyse
- 2 ×1 ml Protéinase K (PK)
- 100 µl Colorant bleu
- 1 ml RNase A
- 48 Cartouches Maxwell® FFPE
- 50 Plongeurs CSC/RSC
- 50 Tubes d'élution (0,5 ml)
- 25 ml Eau sans nucléases

Conditions de stockage : stocker le Kit Maxwell® CSC DNA FFPE entre 15 et 30 °C.

Informations relatives à la sécurité : les cartouches de réactifs contiennent de l'éthanol et de l'isopropanol. Ces substances doivent être considérées comme étant inflammables, nocives et irritantes. Les cartouches FFPE Maxwell® sont conçues pour être utilisées avec des substances potentiellement infectieuses. Les utilisateurs doivent être munis de protection individuelle appropriée (par ex., gants et lunettes étanches) pour la manipulation de ces substances potentiellement infectieuses. Il convient de suivre les directives de l'établissement concernant la manipulation et l'élimination de toute substance potentiellement infectieuse utilisée en conjonction avec ce système.

Attention : manier les cartouches avec précaution – les bords de la bande adhésive peuvent être tranchants.

Informations supplémentaires : les composants du kit Maxwell® CSC DNA FFPE ont été validés et des contrôles de qualité ont été menés pour s'assurer qu'ils fonctionnent ensemble. Il n'est pas recommandé de mélanger des composants de plusieurs lots de kits. Utiliser uniquement les composants fournis dans le kit.



Légende des symboles

Symbole	Explication	Symbole	Explication
IVD	Dispositif médical de diagnostic in vitro	PROMEGA 2800 Woods Hollow Rd. Madison, WI USA	Fabricant
30°C 15°C	Stocker à 15-30 °C.		Nocif. Irritant.
	Important		Avertissement. Risque de pincement.
< n > Σ 25	Réactifs inclus suffisants pour « n » tests	LOT	Numéro de lot
REF	Numéro de catalogue		Ne pas réutiliser.

3. Indication du produit

Le Kit Maxwell® CSC DNA FFPE est conçu pour être utilisé en conjonction avec l'appareil Maxwell® CSC et la méthode de purification de l'ADN Maxwell® CSC FFPE comme dispositif médical de diagnostic in vitro (DIV) pour isoler l'ADN automatiquement à partir d'échantillons de tissus mammaires, pulmonaires ou colorectaux humains fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE). L'ADN purifié est adapté aux essais de diagnostic in vitro fondés sur l'amplification.

Le Kit Maxwell® CSC DNA FFPE doit être utilisé entre 15 et 30 °C. Toute utilisation en dehors de cette plage de température peut entraîner des résultats suboptimaux.

Les échantillons de tissus fixés au formol tamponné neutre à 10 % peuvent être utilisés avec le Kit Maxwell® CSC DNA FFPE.

Le Kit Maxwell® CSC DNA FFPE n'est pas destiné à être utilisé comme test spécifique de diagnostic.

Le Kit Maxwell® CSC DNA FFPE est destiné à un usage professionnel uniquement. Les résultats de diagnostic obtenus à l'aide de l'ADN purifié avec ce système doivent être interprétés conjointement à d'autres données cliniques ou de laboratoire.



4. Limites d'utilisation du produit

Le Kit Maxwell® CSC DNA FFPE est conçu uniquement pour être utilisé avec des d'échantillons de tissus mammaires, pulmonaires ou colorectaux humains fixés au formol et inclus en paraffine. Il n'est pas conçu pour être utilisé avec des échantillons de tissus non fixés au formol et inclus en paraffine tels quel les échantillons de tissus frais ou congelés, ou avec des échantillons FFPE d'autres tissus que les tissus mammaires, pulmonaires ou colorectaux humains. Le Kit Maxwell® CSC DNA FFPE n'est pas conçu pour être utilisé avec d'autres types d'échantillons, notamment les tissus non humains, ou pour la purification de l'ARN.

Le Kit Maxwell® CSC DNA FFPE n'est pas conçu pour être utilisé avec des échantillons de tissus préparés à l'aide de fixatifs autres que le formol tamponné neutre à 10 %.

Les performances du Kit Maxwell® CSC DNA FFPE ont été évaluées en isolant de l'ADN à partir d'échantillons de tissus FFPE de tailles comprises entre 0,1 et 2,0 mm^3. Ce kit ne doit pas être utilisé avec des échantillons en dehors de cette plage.

L'utilisateur est tenu de valider la performance des acides nucléiques purifiés dans les applications de diagnostic ultérieures. Des contrôles appropriés doivent être inclus dans les applications de diagnostic ultérieures qui utilisent l'ADN purifié à l'aide du Kit Maxwell® CSC DNA FFPE.

5. Avant de commencer

Matériel à fournir par l'utilisateur

- microcentrifugeuse
- pipettes et cônes pour le transfert des échantillons dans les cartouches de réactifs préremplies avant le traitement
- tubes de 1,5 à 2,0 ml pour l'incubation des échantillons (par ex. microtubes de 1,5 ml, Réf. V1231)
- blocs chauffants réglés à 56 °C et à 80 °C. **Remarque :** les blocs chauffants doivent être préchauffés à la température souhaitée. La température réelle des blocs chauffants doit être mesurée en tenant compte de la plage d'étalonnage du thermomètre utilisé.
- échantillons FFPE (0,1 à 2,0 mm^3). **Remarque :** les échantillons doivent être stockés à température ambiante (15–30 °C).
- lames de rasoir. **Remarque :** soyez prudent lors de l'utilisation d'une lame de rasoir pour détacher un échantillon de la lame de microscope.



5.A. Préparation des échantillons FFPE

Traitement des sections de tissus

1. Placez chaque section dans un tube à microcentrifugation de 1,5 ml. En cas d'utilisation de sections de tissus montées sur des lames de microscope, détachez chaque section à l'aide d'une lame de rasoir propre.
2. Ajoutez 300 µl d'huile minérale aux tubes contenant les échantillons. Mélangez au vortex pendant 10 secondes.
3. Chauffez les échantillons à 80 °C pendant 2 minutes. Placez les échantillons à température ambiante lors de la préparation du mélange maître.
4. Préparez un mélange maître contenant le tampon de lyse, la protéinase K et le colorant bleu selon le tableau ci-dessous.

Réactif	Quantité par réaction	Réactions (nombre souhaité + 1)	Total
Tampon de lyse	224 µl	n + 1	224 × (n + 1) µl
Protéinase K	25 µl	n + 1	25 × (n + 1) µl
Colorant bleu	1 µl	n + 1	1 × (n + 1) µl

5. Ajoutez 250 µl de mélange maître à chaque tube d'échantillon et passez au vortex pendant 5 secondes.
6. Centrifugez à 10 000 × *g* pendant 20 secondes pour séparer les couches. Si un culot est présent dans la phase aqueuse (couche inférieure, bleue), mélangez doucement la phase aqueuse à l'aide d'une pipette.
7. Transférez les tubes d'échantillons au bloc chauffant à 56 °C et incubez pendant 30 minutes.
8. Transférez les tubes d'échantillons au bloc chauffant à 80 °C et incubez pendant 4 heures.
9. Retirez les tubes d'échantillons du bloc chauffant et laissez-les refroidir à température ambiante pendant 5 minutes.
10. Ajoutez 10 µl de RNase A à chaque tube. Mélangez en pipetant.
11. Incubez à température ambiante (15–30 °C) pendant 5 minutes.
12. Centrifugez les tubes dans une microcentrifugeuse pendant 5 minutes à la vitesse maximale.
13. Transférez la phase aqueuse (bleue) contenant l'ADN au puits n° 1 de la cartouche Maxwell® FFPE immédiatement avant de procéder à l'étape 5 de la Section 6.



5.B. Préparation des cartouches Maxwell® FFPE

1. Changez de gants avant de manipuler les cartouches Maxwell® FFPE, les plongeurs CSC/RSC et les tubes d'élution. Les cartouches sont placées sur le portoir de la plateforme Maxwell® CSC en dehors de l'appareil, et le portoir contenant les cartouches et échantillons est alors transféré à l'appareil pour procéder à la purification. Placez les cartouches à utiliser sur le portoir de la plateforme Maxwell® CSC (Figure 2). Placez chaque cartouche sur le portoir de la plateforme, en vous assurant que le puits nº 1 (le plus grand puits de la cartouche) est le plus éloigné de tube d'élution. Appuyez verticalement sur la cartouche pour bien l'engager dans le portoir. Vérifiez que les deux extrémités de la cartouche sont engagées à fond dans le portoir de la plateforme. Retirez soigneusement la bande adhésive de protection de manière à la retirer intégralement du haut de la cartouche. Assurez-vous que toutes les bandes adhésives et tous les résidus de colle soient bien retirés avant de placer les cartouches dans le portoir de la plateforme.



Attention : maniez les cartouches avec précaution. Les bords de la bande adhésive peuvent être tranchants.

2. Placez un plongeur dans le puits n° 8 de chaque cartouche.

   Remarque : utilisez uniquement les plongeurs fournis dans le Kit Maxwell® CSC FFPE. Les plongeurs des Kits Maxwell® 16 LEV et SEV ne sont pas compatibles avec l'appareil Maxwell® CSC.

3. Pour chaque cartouche, placez un tube d'élution vide à l'emplacement prévu à cet effet dans le portoir de la plateforme Maxwell® CSC.

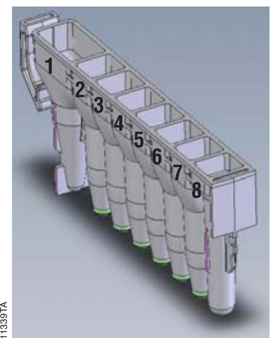
   Remarque : utilisez uniquement les tubes d'élution fournis dans le Kit Maxwell® CSC DNA FFPE. Les autres tubes d'élution peuvent ne pas être compatibles avec l'appareil Maxwell® CSC et peuvent influencer le processus de purification de l'ADN.

4. Ajoutez 50 µl d'eau sans nucléases au fond de chaque tube d'élution.

   Remarque : utilisez uniquement l'eau sans nucléases fournie dans le Kit Maxwell® CSC DNA FFPE. L'utilisation d'un autre tampon d'élution peut influencer la purification de l'ADN.

Remarques concernant la préparation des cartouches

1. Si vous traitez moins de 16 échantillons, centrez les cartouches sur le portoir de la plateforme.
2. Les éclaboussures d'échantillons ou de réactifs présentes sur toute surface du portoir de la plateforme Maxwell® CSC doivent être nettoyées comme indiqué dans le *Manuel d'utilisation de l'appareil Maxwell® CSC*, nº TM373. N'utilisez d'eau de Javel sur aucune partie de l'appareil.



1. Tampon de liaison
2. Particules magnétiques
3. Solution de lavage
4. Solution de lavage
5. Solution de lavage
6. Solution de lavage
7. Vide
8. Vide

Contenu des puits à ajouter par l'utilisateur :

1. Échantillon prétraité
8. Plongeurs CSC/RSC

Figure 1. Cartouche Maxwell® FFPE. Cette figure illustre le contenu d'une cartouche. L'échantillon FFPE prétraité est ajouté au puits nº 1, et un plongeur est ajouté au puits nº 8.





Figure 2. Installation et configuration du portoir de la plateforme Maxwell® CSC. L'eau sans nucléases est ajoutée aux tubes d'élution comme indiqué.

6. Exécution de l'appareil

La méthode Maxwell® CSC FFPE peut être téléchargée à partir du site Internet de Promega : **www.promega.com/resources/tools/maxwellcscmethod**. Veuillez consulter le *Manuel technique d'installation des méthodes Maxwell® CSC* nº TM401 pour de plus amples informations.

1. Mettez sous tension l'appareil Maxwell® CSC et la tablette. L'interface utilisateur de l'appareil va démarrer automatiquement, réaliser une vérification et mettre en position toutes les pièces mobiles.
2. Sélectionnez « Start » (Démarrer) à partir de l'écran d'Accueil.
3. Scannez le code-barres de l'étiquette du Kit Maxwell® CSC DNA FFPE ou saisissez-le manuellement afin de sélectionner automatiquement la méthode à exécuter (Figure 3).

   Remarque : le code-barres de la méthode du Kit Maxwell® CSC DNA FFPE est requis pour pouvoir purifier l'ADN sur l'appareil Maxwell® CSC. L'étiquette du kit contient deux codes-barres. Celui de la méthode est indiqué dans la Figure 3 ci-dessous. Si le code-barres ne peut pas être scanné, contactez le service technique de Promega.



6. Exécution de l'appareil (suite)

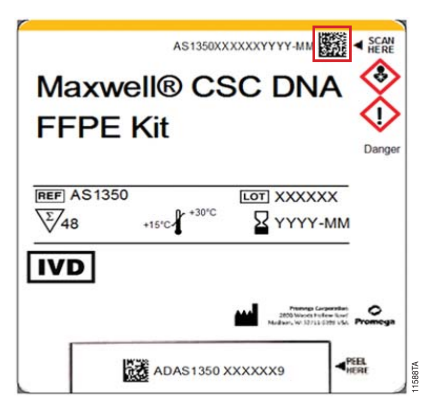


Figure 3. Étiquette du kit indiquant l'emplacement du code-barres à scanner pour charger la méthode. Le code-barres de la méthode sur l'étiquette du kit devant être scanné pour démarrer une purification est encadré en rouge.

4. Sélectionnez la position des cartouches à traiter (consultez le *Manuel d'utilisation de l'appareil Maxwell® CSC*, no TM373) et scannez ou saisissez manuellement les données de suivi des échantillons. Le cas échéant, désélectionnez les positions non utilisées. Une fois cette opération terminée, sélectionnez « Proceed » (Continuer).

5. Vérifiez que les échantillons ont été ajoutés au puits nº 1 des cartouches (comme indiqué à la Section 5.A), que les cartouches sont chargées dans l'appareil, que les tubes d'élution contenant 50 µl d'eau sans nucléases sont présents et que les plongeurs ont été placés dans le puits nº 8.

6. Transférez le portoir de la plateforme Maxwell® CSC contenant les cartouches préparées dans l'appareil. Vérifiez que le portoir est placé dans l'appareil Maxwell® CSC de façon à ce que les tubes d'élution se trouvent du côté de la porte. Le portoir ne peut être inséré dans l'appareil que dans cette orientation. Si vous avez du mal à insérer le portoir sur la plateforme, vérifiez que celui-ci est dans la bonne orientation. Assurez-vous de placer le portoir horizontalement sur la plateforme.

   Remarque : tenez le portoir de la plateforme Maxwell® CSC sur les côtés pour éviter d'en déloger les cartouches.



   Avertissement : risque de pincement.



7. Vérifiez que toutes les étapes de prétraitement requises ont été effectuées, puis appuyez sur « Start » (Démarrer) pour fermer la porte de l'appareil et démarrer la purification.

8. L'appareil Maxwell® CSC commencera immédiatement le cycle de purification. L'écran affichera les étapes effectuées ainsi que le temps approximatif restant dans le cycle.

   Remarque : si le cycle est annulé avant la fin, l'appareil libèrera les particules des plongeurs et éjectera ces derniers dans le puits n°8 de la cartouche. Les échantillons seront perdus. N'essayez pas de repurifier les échantillons après l'annulation d'un cycle de l'appareil.

9. À l'issue du cycle de purification automatisée, l'écran de la tablette affichera un message indiquant que la méthode est finie : « End of Run » (Fin du cycle).



Fin du cycle

10. À la fin de la méthode, suivez les instructions à l'écran pour ouvrir la porte. Vérifiez que les plongeurs sont placés dans le puits n°8 de la cartouche à la fin du cycle. Retirez le portoir de la plateforme de l'appareil et récupérez les échantillons élués du portoir. Si les plongeurs n'ont pas été éjectés de la barre de fixation des plongeurs, suivez les instructions à l'écran pour effectuer la méthode de nettoyage (Clean Up) pour un cycle annulé, ou sélectionnez cette même méthode à partir de l'écran Settings (Paramètres) pour un cycle terminé normalement. Ceci éjectera les plongeurs encore attachés.
11. Immédiatement après le cycle, pour éviter l'évaporation des éluats, refermez les tubes d'élution contenant l'ADN et retirez-les de l'appareil. Retirez le portoir de l'appareil Maxwell® CSC.

    Remarque : à l'issue de la procédure de purification automatisée, le portoir de la plateforme Maxwell® CSC peut être chaud au toucher. Tenez le portoir sur les côtés en le retirant de l'appareil.

    Assurez-vous que les échantillons ont été retirés de l'appareil avant d'exécuter un cycle de décontamination par UV pour éviter d'endommager les acides nucléiques purifiés.
12. Retirez les cartouches et les plongeurs du portoir de la plateforme Maxwell® CSC et éliminez le tout en tant que déchets dangereux selon les procédures de votre établissement. Les cartouches, plongeurs et tubes d'élution sont à usage unique. Ne réutilisez pas les cartouches Maxwell® FFPE, les plongeurs CSC/RSC ou les tubes d'élution.

7. Après la purification

Déterminez si le rendement en ADN purifié des échantillons répond aux exigences des essais diagnostiques ultérieurs avant de les utiliser. Les performances du kit ont été évaluées en fonction de la purification d'ADN pouvant être amplifié. D'autres méthodes de quantification, telles que l'absorbance ou la liaison de colorants fluorescents, peuvent présenter une mauvaise corrélation avec l'amplification (1). Les lectures d'absorbance des échantillons FFPE purifiés pouvant surestimer le rendement, il est recommandé d'utiliser d'autres méthodes de quantification (1).



8. Dépannage

Pour toute question qui ne serait pas traitée ci-dessous, veuillez consulter une succursale ou un distributeur Promega local. Les coordonnées de ceux-ci sont disponibles au site : **www.promega.com.** Adresse électronique : **techserv@promega.com**

Symptômes	Causes et commentaires
Concentration en ADN de l'éluat plus faible que prévu	Les performances du Kit ont été évaluées en isolant de l'ADN à partir d'échantillons de tissus FFPE de tailles comprises entre 0,1 et 2,0 mm^3. Ce kit n'est pas conçu pour les échantillons en dehors de cette plage. Utiliser des sections de taille appropriée.
Une section ordinaire devrait produire de l'ADN amplifiable, en fonction de la taille et de la cellularité du tissu, des conditions de fixation au formol et de la manipulation.	Ce kit a été conçu pour être utilisé avec des d'échantillons de tissus mammaires, pulmonaires ou colorectaux humains fixés au formol et inclus en paraffine. Il n'a pas été conçu pour être utilisé avec des échantillons de tissus non fixés au formol et inclus en paraffine tels quel les échantillons de tissus frais ou congelés, ou avec des échantillons FFPE d'autres tissus que les tissus mammaires, pulmonaires ou colorectaux humains. Les températures et durées d'incubation n'ont été testées qu'avec des échantillons de tissus mammaires, pulmonaires et colorectaux humains.
	Ce kit n'est pas conçu pour être utilisé avec des échantillons de tissus préparés à l'aide de fixatifs autres que le formol tamponné neutre à 10 %. S'adresser au laboratoire de pathologie ou au fournisseur pour vérifier qu'un autre fixatif n'a pas été utilisé. Aucune revendication n'est faite dans le cas des lames ou sections colorées. Répéter la purification avec une lame ou section non colorée.
	Les performances du kit ont été évaluées en fonction de la purification d'ADN pouvant être amplifié. D'autres méthodes de quantification, telles que l'absorbance ou la liaison de colorants fluorescents, peuvent présenter une mauvaise corrélation avec l'amplification. Utiliser une méthode de quantification basée sur l'amplification pour évaluer la purification.
Qualité moins bonne que prévu	La section de tissu utilisée pour la purification peut comporter de l'ADN fragmenté en raison des conditions de fixation ou de manipulation. Si l'ADN est fragmenté avant la purification, l'ADN purifié avec ce kit le sera également. Répéter avec une section adjacente pour déterminer si la section ou la procédure est en cause.
L'éluat contient de l'ADN principalement fragmenté ou des inhibiteurs qui interfèrent avec les essais ultérieurs.	Certains essais basés sur l'amplification sont particulièrement sensibles à la présence d'inhibiteurs. Des contrôles appropriés de l'essai ultérieur devraient permettre d'identifier la présence d'un inhibiteur de l'amplification dans l'éluat. Il incombe à l'utilisateur de vérifier la compatibilité de ce produit avec les essais ultérieurs.



9. Référence

1. Bonin, S. *et al.* (2010) Multicentre validation study of nucleic acids extraction from FFPE tissues. *Virchows Arch.* **457**,309–17.

10. Summary of Changes

The following change was made to the 1/15 revision of this document:

1. Updated component name from Plongeurs CSC to Plongeurs CSC/RSC.

[a] Brevets américains n° 6 027 945, 6 368 800 et 6 673 631, brevets européens n° 0895546, 1367137 et 1204741, brevets japonais n° 3253638 et 4425513.